

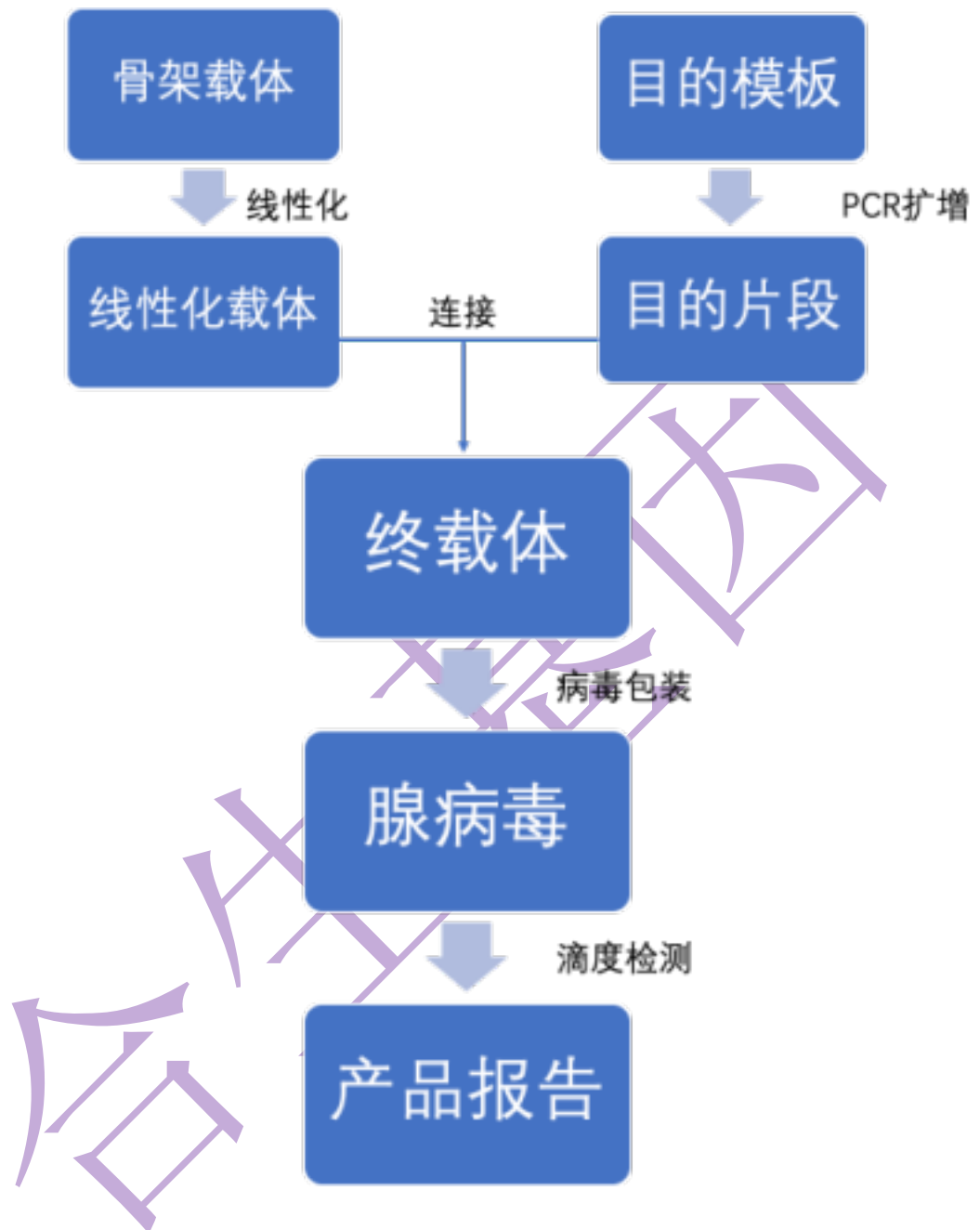
过表达腺病毒构建和包装手册

1. 服务流程	3
2. 仪器与试剂	4
3. 构建实例	5
3.1. 基因过表达腺病毒载体构建	5
3.1.1. 目的基因	5
3.1.2. 载体信息	5
3.1.1. 载体图谱：	5
3.2. 质粒构建步骤	6
3.2.1. 合成引物	6
3.2.2. PCR 产物片段检测和回收	6
3.2.3. 载体酶切	6
3.2.4. 连接	7
3.2.5. 转化涂板及菌斑鉴定	7
3.2.6. 阳性克隆摇菌及质粒提取	7
3.2.7. 质粒质控（酶切鉴定和目的基因测序）	8
4. 腺病毒包装	10
4.1. AD293 细胞准备	10
4.2. 腺病毒包装系统转染	10
4.3. 腺病毒收集及浓缩	11
4.4. 病毒质量检测	11
4.4.1. 物理指标检测	12

4.4.2. 无菌检测	12
4.4.3. 病毒滴度测定	12



1. 服务流程



2. 仪器与试剂

表 1 主要仪器及生产商

仪器名称	生产厂家
Sorvall Legend Mircro 17 台式离心机	美国 ThermoFisher 公司
Sorvall ST 16R 冷冻离心机	美国 ThermoFisher 公司
微量移液器	德国 Eppendorf 公司
生物安全柜	新加坡 ESCO 公司
EVOS 荧光显微成像系统	美国 ThermoFisher 公司
恒温二氧化碳细胞培养箱	德国 Binder 公司
实验室耗材 I (移液枪头、1.5/2.0 mL 离心管)	美国 Axygen 公司
实验室耗材 II (细胞培养皿、移液管等)	美国 Corning 公司
超低温冷冻冰箱	美国 ThermoFisher 公司
凝胶成像分析系统	北京赛智创业科技有限公司
凝胶电泳系统	美国 BioRad 公司

表 2 主要试剂及生产商

试剂名称	生产厂家
质粒小量快速提取试剂盒 (离心柱型)	北京艾德莱生物科技有限公司
限制性内切酶类	美国 NEB 公司/美国 ThermoFisher 公司
DNA Ligase	北京合生基因科技有限公司
腺病毒包装试剂盒	北京合生基因科技有限公司
EpFect Transfection Reagent	北京合生基因科技有限公司
EvaGreen 2× Master Mix	北京合生基因科技有限公司
DMEM 高糖培养基	美国 Gibco 公司
RPMI 1640 培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清	美国 Gibco 公司

3. 构建实例

以 EPCAM (Human) 基因为例描述载体构建过程。

3.1.基因过表达腺病毒载体构建

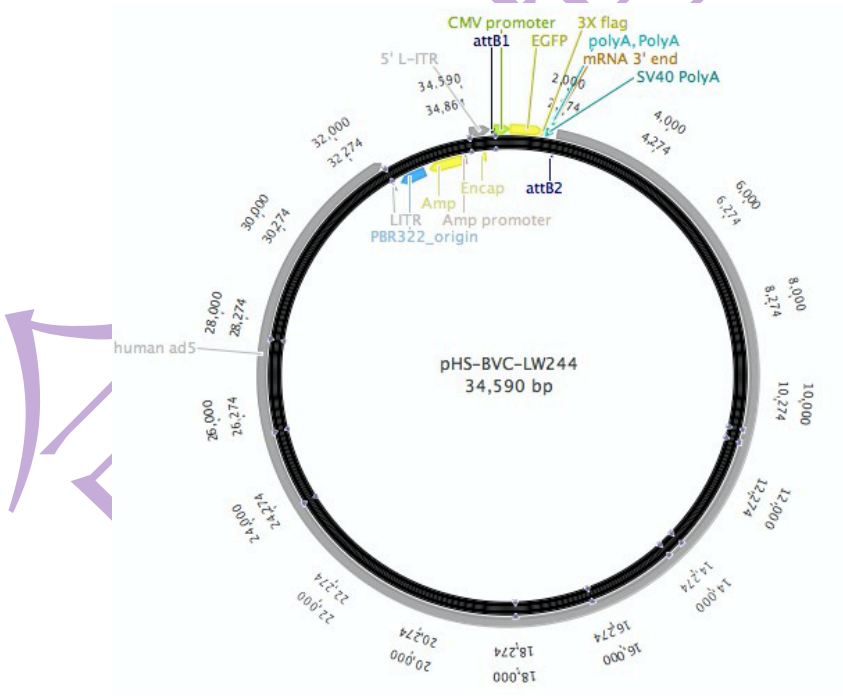
3.1.1. 目的基因

目的基因	转录本	物种	序列长度
EPCAM	NM_002354	Human	945bp

3.1.2. 载体信息

载体编号	载体元件	原核抗性
XX	ADV-CMV-EPCAM -EGFP-3×FLAG	AMP

3.1.1. 载体图谱：



过表达腺病毒空载体示例

3.2.质粒构建步骤

3.2.1. 合成引物

PCR 扩增目的片段，PCR 体系如下：

2×Buffer	25 μL
Enzyme	1 μL
2mM dNTP	10 μL
Primer1	1.5 μL
Primer2	1.5 μL
template	适量
ddH ₂ O	Add to 50 μL

备注：模板一般用量 1-100ng，最佳模板用量根据实际情况而定。

反应条件：

1 cycle	30 cycles			1 cycle	1cycles
95℃	98℃	55℃	72℃	72℃	4℃
4min	30s	30s	1min	7min	

3.2.2. PCR 产物片段检测和回收

- 1) PCR 扩增完成后，需进行凝胶电泳检测扩增的条带是否正确，正确的条带进行切胶回收；
- 2) 骨架载体酶切和 PCR 产物片段回收；
- 3) 得到回收产物后，将其与骨架载体使用同样的限制性内切酶进行酶切消化。

3.2.3. 载体酶切

酶切骨架载体，对载体酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，回收目的条带：

酶切体系:

10x buffer	2 μ L
酶 1	1 μ L
酶 2	1 μ L
Plasmid/product	2~3 μ L
Add ddH ₂ O to	20 μ L

3.2.4. 连接

得到回收产物后，选用 T4 连接酶进行连接，其反应体系如下所示：

反应体系

10× T4 ligase buffer	1 μ L
T4 ligase	1 μ L
PCR 回收产物	100 ng
骨架载体回收产物	100 ng
Add ddH ₂ O to	10 μ L

反应条件：16℃ 恒温金属浴反应0.5-1 h，之后取出进行转化。

3.2.5. 转化涂板及菌斑鉴定

无缝拼接后产物 5-10 μ L 转化至 100 μ L 感受态，42℃ 金属浴，热激 1 min，冰上迅速预冷 2 min，在超净工作台中，加入 600 μ L 无抗培养基，37℃ 摇床振荡培养 1 h，取适量菌液涂布在含有相应抗生素的平板上，在恒温培养箱中倒置培养 12-16 h。菌落 PCR 后鉴定阳性克隆，

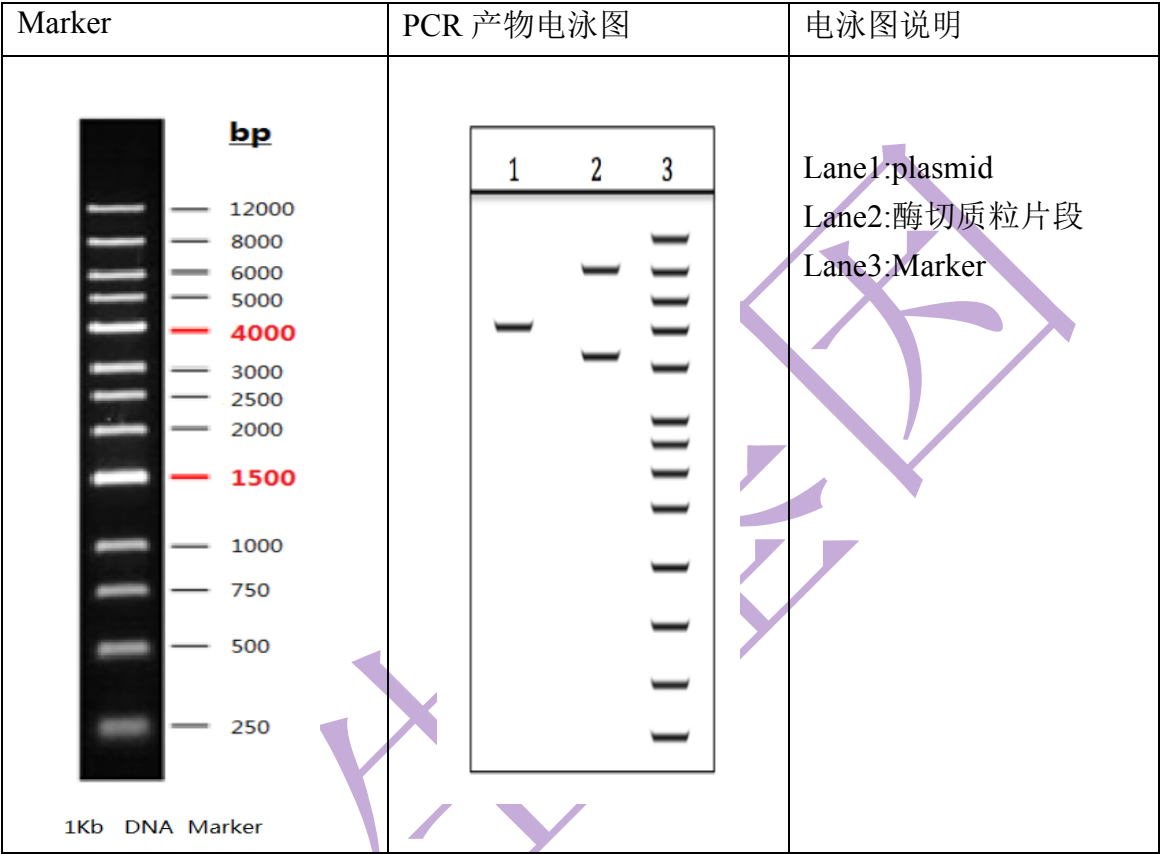
3.2.6. 阳性克隆摇菌及质粒提取

挑选 3-4 个单菌落摇菌，加入相应抗性培养基摇菌过夜（8 mL LB 液体培养基），然后参照质粒抽提试剂盒进行质粒抽提。

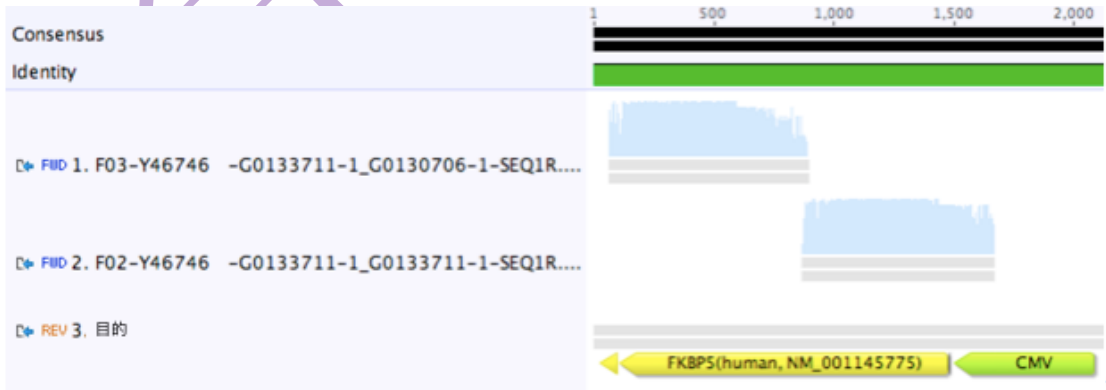
3.2.7. 质粒质控（酶切鉴定和目的基因测序）

完成过表达腺病毒质粒构建后 ,分别使用限制性内切酶对质粒进行了酶切鉴定以及目的基因的测序比对鉴定，以获得构建正确的质粒。

电泳结果示例



目的基因测序比对结果



目的基因序列信息

载体编号	基因 CDS 序列
目的基因	<p>基因名称：EPCAM； CDS: NM_002354</p> <p>5-ATGGCGCCCCCGCAGGTCCTCGCGTTCGGGCTTCTGCTTGCCGCGG CGACGGCGACTTTTGCCGCAGCTCAGGAAGAATGTGTCTGTGAAAAC ACAAGCTGGCCGTAAACTGCTTTGTGAATAATAATCGTCAATGCCAGT GTACTTCAGTTGGTGCACAAAATACTGTCATTTGCTCAAAGCTGGCTGC CAAATGTTTGGTGATGAAGGCAGAAATGAATGGCTCAAACTTGGGA GAAGAGCAAAACCTGAAGGGGCCCTCCAGAACAATGATGGGCTTTAT GATCCTGACTGCGATGAGAGCGGGCTCTTTAAGGCCAAGCAGTGCAA CGGCACCTCCATGTGCTGGTGTGTGAACACTGCTGGGGTCAGAAGAAC AGACAAGGACACTGAAATAACCTGCTCTGAGCGAGTGAGAACCTACT GGATCATCATTGAACTAAAACACAAAGCAAGAGAAAAACCTTATGATA GTAAAAGTTTGCGGACTGCACTTCAGAAGGAGATCACAACGCGTTATC AACTGGATCCAAAATTTATCACGAGTATTTTGTATGAGAATAATGTTAT CACTATTGATCTGGTTCAAATTCTTCTCAAAAAACTCAGAATGATGTG GACATAGCTGATGTGGCTTATTATTTTGAAAAAGATGTTAAAGGTGAAT CCTTGTTTCATTCTAAGAAAATGGACCTGACAGTAAATGGGGAACAAC TGGATCTGGATCCTGGTCAAACCTTAATTTATTATGTTGATGAAAAAGC ACCTGAATTCTCAATGCAGGGTCTAAAAGCTGGTGTTATTGCTGTTATT GTGGTTGTGGTGATAGCAGTTGTTGCTGGAATTGTTGTGCTGGTTATTT CCAGAAAGAAGAGAATGGCAAAGTATGAGAAGGCTGAGATAAAGGA GATGGGTGAGATGCATAGGGAACCTCAATGCA-3'</p>

4. 腺病毒包装



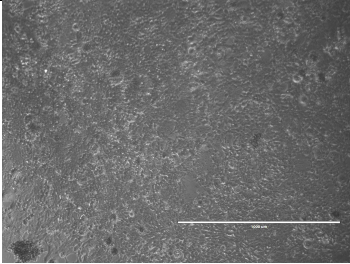
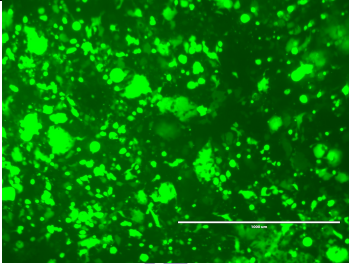
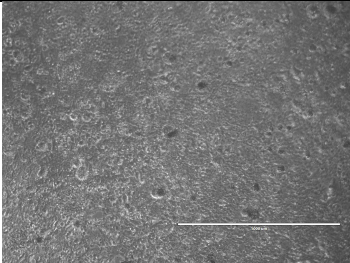
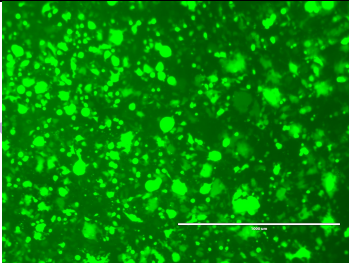
4.1. AD293 细胞准备

将 $3\sim 5\times 10^6$ 个 AD293 细胞传代接种至 100 mm 细胞培养皿中，置于 37 °C，5% CO₂ 的培养箱中，培养 16 h~24 h。传代过程中需要将细胞充分消化为单细胞悬液，以获得较好的包装效果。

4.2. 腺病毒包装系统转染

- 1) 将腺病毒骨架质粒线性化转染 AD293 细胞
- 2) 观察感染 72h 荧光表达情况。

过表达腺病毒包装过程中荧光表达情况示例

载体编号	白光	绿色荧光
过表达		
对照		

4.3. 腺病毒收集及浓缩

- 1) 7-10 天时观察 AD 293 细胞状态及出毒效率，将上清及细胞全部收集置于-80℃反复冻融 3 次；
- 2) 将冻融后的病毒悬液依次接种三次，接种量做梯度处理，分别收集 3-5 天细胞病变完全的感染组，置于-80℃反复冻融 3 次；
- 3) 用适量腺病毒悬液感染 AD 293 15 cm 培养皿，3-5 天待细胞病变完全收集病毒悬液置于-80℃反复冻融 3 次；
- 4) 5000 rpm 离心 10 min，弃细胞碎片，收集上清加 PEG 8000 浓缩过夜。12000 rpm 离心上述混合物 20 min，弃上清，将沉淀物悬浮在密度为 1.10 g / mL CsCl 溶液中；
- 5) CsCl 密度梯度离心，2,0000 rpm 离心 3h，收集密度在 1.30g / mL 和 1.40g / mL 之间的病毒于透析袋中，在透析缓冲液中 4℃过夜，中间换一次透析液。收集病毒，测定病毒滴度；

4.4. 病毒质量检测

腺病毒的质量控制要点包括物理状态检测、无菌检测及病毒滴度检测。

4.4.1. 物理指标检测

- 1) 颜色判定：通过肉眼判定，腺病毒保存液呈澄清液体状。
- 2) 粘稠度判定：用 20-200 μL 规格移液器缓慢吸取 50 μL 腺病毒保存液体，无明显粘稠感或吸液滞后现象；

4.4.2. 无菌检测

将病毒加入 293 细胞验证，正常培养 24 h 后镜检，无任何细菌及真菌污染情况，同时参照空细胞组，细胞间隙无明显颗粒存在，培养基澄清透明。

4.4.3. 病毒滴度测定

- 1) 选取状态良好的 AD 293 细胞，使用完全培养及重悬细胞，制备成 2.5×10^5 个 / mL 的细胞悬液，24 孔板每个孔中接种 1mL 细胞，37°C、5%CO₂ 培养 1 小时。
- 2) 准备好 10 倍梯度稀释的病毒样品，每孔空逐滴加入 30 μL 病毒样品。
- 3) 37°C、5% CO₂ 培养 2 天。
- 4) 轻轻去除培养液，将 24 孔板侧壁缓慢加入预冷的甲醇 0.5mL，-20°C 固定 10 min。
- 5) 使用 500 μL 含 10% BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次(切记将细胞冲起)。
- 6) 使用含 10% BSA 的 PBS 稀释 1000 \times anti-Hexon 抗体，每孔中添加 250 μL ，-37°C 孵育 1 小时。
- 7) 使用 500 μL 含 10% BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次(切记将细胞冲起)。
- 8) 使用含 10% BSA 的 PBS 稀释 500 \times 辣根过氧化物酶标记的二抗，每孔中添加 250 μL ，-37°C 孵育 1 小时。
- 9) 使用 500 μL 含 10% BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次(切记将细胞冲起)。
- 10) 加入 250 μL 新配置的 1 \times DAB 工作液至每孔，室温孵育 10 min。
- 11) 弃去 DAB，使用 1ml 含 10% BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞。
- 12) 每孔随机选择 5 个视野，使用光学显微镜 10 \times 物镜下计算阳性细胞个数。

- 13) 计算没孔阳性细胞的平均个数和病毒滴度。
- 14) 计算显微镜下视野中阳性细胞的平均个数。选择一个梯度，此梯度视野中有 5-50 个阳性细胞，随机选择至少 5 个区域计数。
- 15) 计算 24 孔板中每孔视野的个数。对于多数显微镜 标准 10×目镜与 10×物镜所观察到的视野直径为 1.8mm，因此每个视野的面积= $3.14 \times (D/2)^2 = 3.14 \times 0.92 = 2.54 \text{ mm}^2$ 。
- 16) 对于一个标准 24 孔板，培养面积为 2.0 cm^2 ，因此每孔视野数= $2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \text{ mm}^2 = 2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 = 79$ ，如果您不能确定您的物镜所观察到的视野直径或者您使用的不是 10×物镜，视野直径可用血球计数板来确定。

17) 滴度计算式

$$\text{Viral Titer} = \frac{(\text{average positive cells / field}) \times (79 \text{ fields / well}) \times \text{dilution factor}}{(0.03\text{mL})}$$

- 18) 本次实验在显微镜下 5 个视野中计算的阳性细胞平均数为 6.6，此孔病毒稀释了 10^6 倍，根据以上公式得出：

$$\text{病毒滴度} = \frac{6.6 \times 79 \times 10^6}{0.03} = 1.73 \times 10^{10} \text{ IFU/mL}$$